**Abschlussbericht des Teilprojekts**

# Entwicklung der Abicap-Technologie zur Detektion von Krankheitserregern in komplexen Proben mittels Immunfiltrationstechnologie

des Verbundvorhabens

**Biologische Gefahrenlagen: Risikobewertung, ultraschnelle Detektion und Identifizierung von bioterroristisch relevanten Agenzien (BiGRudi)**

**Förderkennzeichen: 13N9596**

**Laufzeit: 01.02.2008 - 31.12.2011**

Verbundpartner:

- Robert Koch-Institut (RKI)
- Philipps-Universität Marburg (PhU)
- Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (BBK)
- Bundeskriminalamt (BKA)
- Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg (LGA)
- Zenteris GmbH
- Scienion AG
- GenExpress
- Aptares AG
- Charite / Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
- Freie Universität Berlin
- Charite / Institut für Pharmakologie
- Technische Fachhochschule Wildau (TFHW)

**Inhalt**

1 Aufgabenstellung

2 Voraussetzungen

3 Planung und Ablauf des Vorhabens

4 Wissenschaftlicher Stand zum Zeitpunkt des Projektbeginns

5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

6 Darstellung der erzielten Ergebnisse

6.1 Testentwicklung am Beispiel des Analyten SEB
6.2 Testentwicklung am Beispiel des Analyten Marburgvirus
6.3 Testentwicklung am Beispiel des Analyten B.anthracis
6.4 Testentwicklung am Beispiel des Analyten Orthopockenviren
6.5 Testentwicklung am Beispiel des Analyten BoNT/F
6.6 Testentwicklung am Beispiel des Analyten NTNH
6.7 Testentwicklung am Beispiel des Analyten BoNT/E
6.8 Weiterentwicklung eines dekontaminierbaren Abicapphotometers
6.9 Einsatz von Aptameren auf der Abicapplattform zur Detektion von H1N1

7 Verwertbarkeit des Ergebnisses und der Erfahrungen

8 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens an anderen Stellen

9 Veröffentlichungen, Poster und Vorträge

## 1 Aufgabenstellung

Im Oktober 2001 gab es in den USA Anschläge mit Anthraxsporen, die zu einer allgemeinen Verunsicherung weltweit führten. Dies wurde unter anderem auch von vielen Trittbrettfahrern genutzt, die mit vorgetäuschten Anschlägen diese Angst weiter schüren. Eine sichere Analyse ist sehr zeitaufwendig und war damals nur in speziellen Labors möglich. Um dem entgegen zu wirken, war eine schnelle und zuverlässige Vor-Ort-Diagnostik zur Detektion von BT-relevanten Agentien unabdingbar. Im Rahmen des Projektes BigRudi sollte dies in Kooperation mit Projektpartnern aus Industrie, Lehre und behördlichen Institutionen realisiert werden. Der Part der FZMB GmbH bestand darin eine Plattform zu entwickeln bzw. bereit zu stellen, auf der unter anderem Detektionsreagentien der Projektpartner etabliert werden sollten. Darüber hinaus sollte die Plattform im Hinblick auf eine verbesserte Feldtauglichkeit hin weiter entwickelt werden. Abschließend sollten die etablierten Tests auf diversen Übungen der Anwender zum Einsatz kommen.

## 2 Voraussetzungen

Mit Zusendung des Bewilligungsbescheides seitens des BMBF vom 25.02.2008 waren die Voraussetzungen zur Durchführung des Projektes erfüllt. Die Abwicklung der Zuwendung wird im Auftrag des BMBF durch den Projektträger (VDI Technologiezentrum GmbH) koordiniert.

## 3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Koordination der Verbundpartner erfolgte durch Herrn Ellerbrok von Seiten des Robert Koch Institutes. Das Teilprojekt des FZMB war in 3 Arbeitspakete gegliedert (26/27/28). Das erste Arbeitspaket unterteilte sich dabei in weitere 4 Untergruppen. Die Abarbeitung erfolgte im Zeitraum vom 1. Quartal 2008 bis 4. Quartal 2010. Das zweite Arbeitspaket wurde im Zeitraum 3. Quartal 2008 bis 2. Quartal 2010 abgearbeitet. Das letzte Arbeitspaket wurde im Zeitraum 4. Quartal 2009 bis 4. Quartal 2011 bearbeitet. Es sei darauf hingewiesen, dass es in der Anlaufphase des Projektes zu Lieferengpässen der Reagentien (z.Bsp. Antikörper) der Kooperationspartner gekommen ist. Dies führte zu einer zeitlichen Ausdehnung der Bearbeitung der Arbeitspakete, anders wie im ursprünglichen Antrag geplant. Um das Projekt erfolgreich beenden zu können, wurde eine kostenneutrale Verlängerung des Projektes (bis 4. Quartal 2011) beantragt und genehmigt.

## 4 Wissenschaftlicher Stand zum Zeitpunkt des Projektbeginns

Der immunologische Nachweis von biologischen Agenzien (z.Bsp. mittels ELISA) ist Bestandteil der Standardverfahren in modernen Laboren. Ein großer Nachteil dabei ist die aufwendige Probenbearbeitung, die ausgebildetes Personal erfordert bzw. der hohe Zeitaufwand, der damit verbunden ist. In der FZMB GmbH Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie wird ein Immunofiltrationsverfahren (ABICAP-Verfahren) betrieben, das in Kombination mit einem Photometer den schnellen Nachweis von Proteinen und Mikroorganismen ermöglicht. Die Nachweisgrenzen dieses schnellen und robusten Verfahrens sind in der Regel mit denen aus Standardverfahren wie dem ELISA vergleichbar. Das Abicap-Verfahren wird von mehreren internationalen Patenten der Senova GmbH geschützt. Eine Lizenzvereinbarung mit der Senova GmbH

einschließlich aller dazu gehörigen Nutzungsbedingungen erlaubt der FZMB GmbH die Weiterentwicklung des ABICAP-Verfahrens. Der Einsatz von Immunofiltrationssäulen zum Nachweis von Mikroorganismen und Proteinen in Kombination mit Enzymkonjugaten wurde am FZMB in Kooperation mit der Dentognostics GmbH bereits früher bearbeitet.

## 5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Über die Kooperation mit den im Projekt aufgeführten Verbundpartnern hinaus gab es keine weitere Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

## 6 Darstellung der erzielten Ergebnisse

Im Ergebnis wurden nachfolgende Analyte auf der Abicapplattform etabliert. Hierzu zählen F.Tularensis, B.anthracis, Ebolavirus, Orthopockenviren, Marburgvirus, Ricin, Botolinum Toxin A,B,E,F, NTNH sowie Staphylokokken Enterotoxin B. Für die Etablierung der Detektionsreagentien auf der Abicapplattform ist initial eine Titration der Antikörperpaare notwendig. Obwohl Antikörper im Allgemeinen sehr spezifische Bindungsmoleküle sind und sich strukturell zu einem großen Teil ähneln, müssen trotzdem für jedes neue Pärchen umfangreiche Tests durchgeführt werden. Dies ist notwendig um die bestmögliche Sensitivität und Spezifität zu erzielen. Um die Sensitivität und Spezifität zu verbessern, wurden verschiedene Immobilisierungsstrategien auf den Filteroberflächen entwickelt und miteinander verglichen. Auch hier zeigte sich, dass die Wahl der Immobilisierungstechnik vom gewählten Antikörper abhängig ist.

Ein Abicaptest wird in der klassischen Variante mit einem Immunofilter (1-Parameter-Säule) ausgeliefert. In einigen Fällen, gerade wenn die Probe in einer komplexen Matrix vorliegt, ist es sinnvoll, zur Absicherung des Messergebnisses eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle in die Abicapsäule mit einzubauen. Hierzu wurden im Rahmen des Projektes 3-Parametrige Abicapsäulen (Messfilter, Negativfilter, Positivfilter) entwickelt und dem jeweiligen Analyten angepasst. Nach Beendigung der Entwicklungsphase wurden Kits hergestellt und zur Testung an die Kooperationspartner (RKI/PhU) versendet.

Neben den üblichen IgG-Antikörpern wurden auch erstmalig IgY Antikörper auf der Abicapplattform erfolgreich eingesetzt. Erfolgreich konnten hier die Analyten B.anthracis und Botulinum Toxin F etabliert werden. Hierzu wurden entsprechende Mengen aus dem Arbeitskreis Antikörper (Frau Dorner, RKI) zur Verfügung gestellt.

Ein nicht unwesentlicher Punkt bei der Entwicklung eines Schnelltests ist die Handhabbarkeit bei den Endanwendern. Nach intensiven Gesprächen mit dem Arbeitskreis der Anwender (Frau Baumanns, BBK) und nach den Erfahrungen aus Übungen im „Feld“ wurde die Abicap Plattform so weiter entwickelt, dass sie selbst unter Vollschutz zu handhaben ist.

Hierzu wurden 3 entscheidende Technologiebausteine entwickelt. Bei dem ersten Baustein handelt es sich um ein bifunktionelles Partikel, im Detail um einen auf Latex basierenden Partikel, der eine Eigenabsorbtion aufweist und mit Antikörpern gekoppelt ist. Im Allgemeinen sind solche Konjugate deutlich insensitiver als enzymatische Nachweisverfahren. Um diese Lücke zu schließen, wurde zusätzlich ein Enzym (HRP) an

den Partikel gekoppelt. Solche Partikel wurden für die Analyte SEB sowie Marburgvirus und Ebolavirus entwickelt. Der zweite Technologiebaustein beinhaltet die Etablierung eines Filtrationsmodules mit integriertem Partikelfreisetzungsfilter. Dieser Baustein bearbeitet zwei Probleme. Zum einen wird die Probe durch Filtration von störenden Matrixbestandteilen befreit und zum anderen erfolgt gleichzeitig eine Vorinkubation des Detektionsreagenz mit dem Analyten. Dies reduziert die Pipettierschritte bzw. verbessert die Handhabung des Testes. Bei dem dritten Technologiebaustein handelt es sich um die Weiterentwicklung eines Photometers zur Auswertung der Abicaptests. Hierbei wurde besonderen Wert auf die Dekontaminierbarkeit des Gerätes gelegt. Darüber hinaus wurde ein Display gewählt, dass auch unter ungünstigen Lichtverhältnissen (z.Bsp. im Spürpanzer oder Feldlabor) ablesbar ist.

## 6.1 Testentwicklung am Beispiel des Analyten SEB

Durch das Robert Koch Institut (Dr. Worbs, Dr. Dorner) wurden Antikörper (Clone (Fänger S1001/4); (Detektor S3849/4 sowie Detektor S419/5) spezifisch gegen Staphylokokken Enterotoxin B zur Verfügung gestellt. Im ersten Schritt wurde der Fängerantikörper in verschiedenen Konzentrationsstufen auf den Filtern immobilisiert. Dabei wurden sowohl adsorbtive als auch kovalente Kopplungstechniken verwendet. Es stellte sich heraus, dass eine kovalente Kopplungstechnik über EDC/S-NHS Chemie die beste Performance bringt. Hierbei wurde die Oberfläche des Filters mit einem NH2 modifizierten Polymer funktionalisiert. Die NH2 Gruppen wurden anschließend mittels Di-Carbonsäure zu COOH-Gruppen umgesetzt. Die COOH-Gruppen wurden mittels EDC/S-NHS Chemie aktiviert. Die abschließende Kopplung erfolgte über Ausbildung einer kovalenten Bindung über NH2-Seitenketten des Antikörpers mit der aktivierten COOH-Gruppe auf der Filteroberfläche. Der Detektionsantikörper wurde mit Biotin markiert. Anschließend wurden die modifizierten Filter auf unspezifische Wechselwirkungen mit dem biotinyliertem Antikörper sowie der Streptavidin modifizierten poly-HRP untersucht. Aus diesen Ergebnissen wurde die Beschichtungskonzentration, die Detektorkonzentration sowie die SA-pHRP Konzentration für den Analyten SEB festgelegt. Mit den gewählten Einstellungen wurde unter Verwendung von SEB-Kontrollmaterial eine Kalibriergerade aufgenommen sowie die Nachweisgrenze bestimmt (Abb. 1). Die Nachweisgrenze lag bei ca. 5 pg/ml.

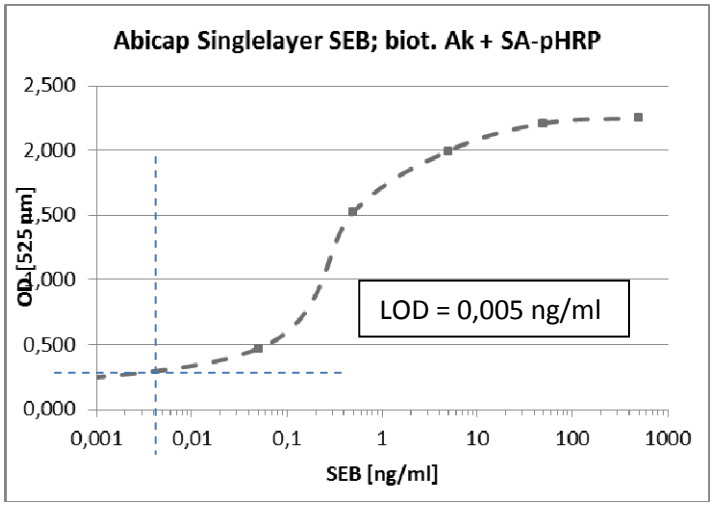


Abb. 1: Abicap (1-Parameter) Fängerantikörper Clone S1001/4; Detektorantikörper biot. Clone S3849/4; Enzymkonjugat SA-polyHRP; Konzentrationsreihe mit SEB.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden zwei weitere Filter in den Abicaptest eingebaut. Dabei handelt es sich um einen Positivkontrollfilter, der mit Antikörper beschichtet ist, welcher spezifisch gegen die Peroxidase, sowie einen Negativfilter der mit BSA beschichtet ist. Die einzelnen Messfelder wurden dabei durch schmale Trennfilter voneinander getrennt. Anschließend wurde auch hier eine Kalibrationsgerade aufgenommen (Abb.2). Die Nachweisgrenze ist vergleichbar mit den Experimenten aus den Singlelayerversuchen.

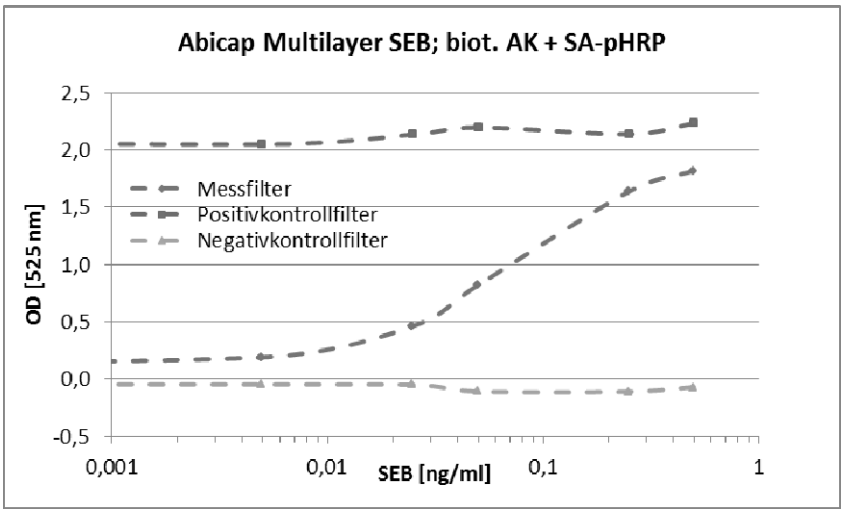


Abb.2: Abicap (3-Parameter) Messfilter (Antikörper Clone S1001/4); Negativkontrollfilter (BSA beschichtet); Positivkontrollfilter (anti-POD beschichtet); Konzentrationsreihe mit SEB; Enzymatischer Assay auf Basis der SA-pHRP Technik.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Multilayersäulen in Form von Kits hergestellt, die für weitere Versuche an das RKI (Frau Worbs) versendet wurden. Frau Worbs führte zudem Experimente mit verschiedenen Probenmatrizes wie Rinderbouillon und Milch durch. In beiden Matrices konnte gespiktes SEB mit dem Abicapsystem nachgewiesen werden.

In einer nachfolgenden Entwicklungsstufe wurde ein bifunktionelles Konjugat, welches spezifisch gegen SEB ist, hergestellt. Hierzu wurde der Detektionsantikörper in Kombination mit der HRP (Peroxidase) auf Latexpartikeln gekoppelt. Anschließend wurde dieses Konjugat auf einem dreidimensionalen Freisetzungsfilter lyophilisiert und in ein Filtrationsmodul eingebaut. In Abb. 3 ist exemplarisch dargestellt, wie der Assay durchgeführt wird.

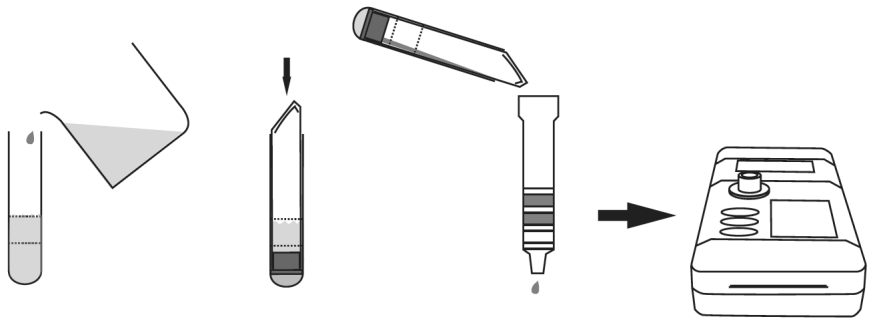

Abb. 3: Schritt 1 (Probenaufgabe in Gefäß); Schritt 2 (Filtration/Vorinkubation der Probe mit Filtermodul inkl. Releasefilter); Schritt 3 (Aufgabe von filtriertem Vorinkubat auf 3-Parametersäule); Schritt 4 (Auslesen der optischen Dichte im Abicapphotometer bei 525 nm)

Im ersten Schritt wird die Probe mit Probenpuffer resuspendiert und in ein Filtrationsgefäß überführt. Anschließend wird die Probe mittels eines Filtrationsstempels filtriert/vorinkubiert. Das Vorinkubat wird auf die Abicapsäule gegeben. Die Säule wird abschließend im Photometer gemessen.

Nach Durchführung einer Kalibration konnte eine Nachweisgrenze von ca. 2 ng/ml erreicht werden. (Abb. 4)

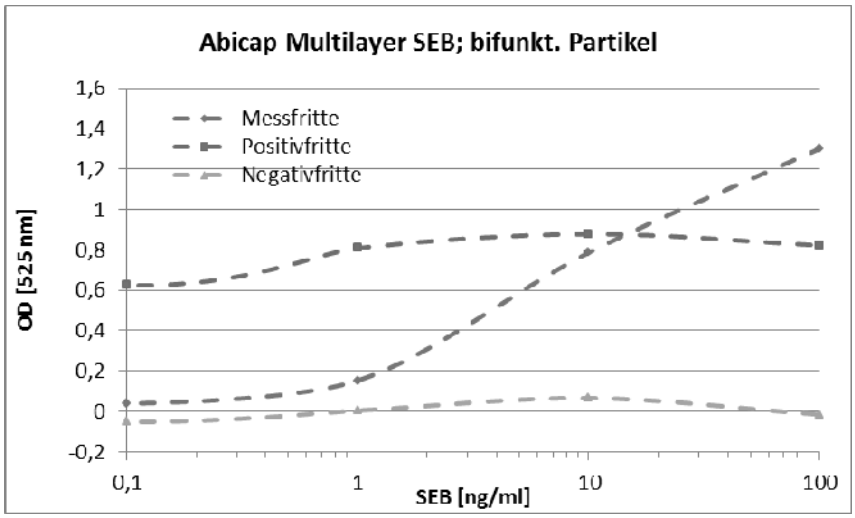


Abb. 4: Abicap (3-Parameter) Messfilter (Antikörper Clone S1001/4); Negativfilter (BSA beschichtet); Positivfilter (anti-FITC Beschichtung) Konzentrationsreihe mit SEB; Colorimetrischer Assay auf Basis von bifunktionellen Partikeln.

Auf Basis des bifunktionellen Partikels wurde ein Kit mit mehreren Tests hergestellt und an das RKI (Frau Worbs) versendet. Frau Worbs führte damit ihrerseits Experimente zur Kalibration und Nachweisgrenzenbestimmung durch und konnte unsere im Vorfeld erbrachten Ergebnisse bestätigen. Auch mit dieser Konfiguration konnte gespiktes SEB in Bouillon und Milch detektiert werden. Darüber hinaus konnte am FZMB mit dieser Konfiguration gespiktes SEB in Mehl, Bentonite, Kaffeeweißer, Talkum, Zucker, Puderzucker nachgewiesen werden. Auf Basis dieser Ergebnisse und nach den Erfahrungsberichten der Anwender wurde ein prinzipielles Testdesign entwickelt wie es im „Feld“ Anwendung finden könnte (Abb. 5).

Abb.5: Blisterschale mit 2 Kammern; Kammer 1: 2 x Abicapsäulen, 2 x Filtrationsmodul, 2 x Wastemodul; Kammer 2: 1 x Waschpufferflasche, 2 x Probenpräparationstubes, 1x Einwegpipette, 1x Positivkontrollpellet.

Es handelt sich hierbei um eine Blisterschale mit 2 Kammern, die mit einer luftdichten Folie gesiegelt sind. In der Schale befinden sich 2 Abicapsäulen, 2 Wastemodule, 2 Probenpreparationstubes, eine Pufferflasche sowie ein Positivkontrollpellet.

## 6.2 Testentwicklung am Beispiel des Analyten Marburgvirus

Bei der Entwicklung eines Abicaptestes zur Detektion von Marburgviren wurde eng mit der Philippsuniversität (Prof. Becker, Dr. Krähling) zusammengearbeitet. Hierbei wurden uns die Antikörperklone 7-11-6 und 40-2-2-7 sowie Virenkontrollmaterial (inaktivierte infizierte Vero-E6-Überstände 1*10EXP5 inf.Partikel/ml) zur Verfügung gestellt. Initial wurde wie bei der SEB Testentwicklung vorgegangen. Es wurden sensitive Abicaptests auf Basis des klassischen enzymatischen Nachweises mittels SA-polyHRP entwickelt. Es wurde eine Kalibriergerade mit inaktiviertem Kontrollmaterial erstellt, sowie die Nachweisgrenze bestimmt (Abb. 6).

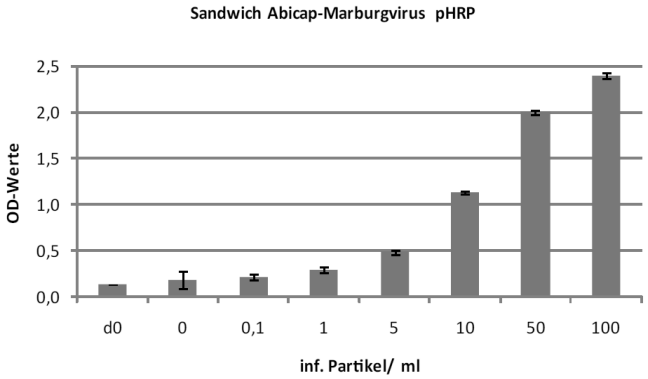


Abb. 6: Abicap (1-Parameter); Messfritte mit Clone 7-11-6; Detektor biot. Clone 40-2-2-7, Konzentrationsreihe mit inakt. Inf. Vero E6 Zellkulturüberstand (Stock 1*10EXP5 inf. Partikel/ml).

Die Nachweisgrenze mit dem zur Verfügung gestellten Kontrollmaterial betrug 5 PFU/ml. Anschließend wurde ein Testkit zusammen gestellt und für weitere Versuche an Frau Krähling (PhU) versendet. An der PhU wurden unter anderem Tests auf Kreuz-reaktivitäten mit anderen Vertretern der Filovirenfamilie durchgeführt. Im Anschluss an diese Experimente wurden bifunktionelle Partikel hergestellt und ein Abicaptest damit aufgebaut. Mit diesem Testdesign wurde eine Kalibriergerade aufgenommen sowie die Nachweisgrenze bestimmt (Abb. 7).

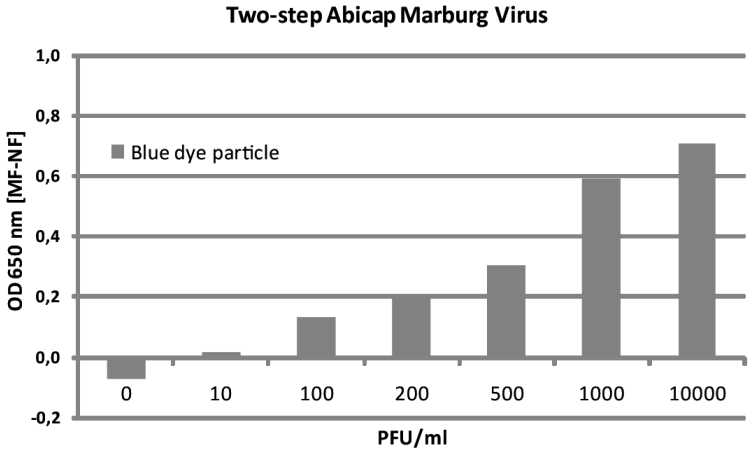


Abb. 7: Abicap (1-Parameter); Messfritte mit Clone 7-11-6; Detektor mit Clone 40-2-2-7 (bifunktionelles Partikelkonjugat) Konzentrationsreihe mit inakt. Inf. Vero E6 Zellkulturüberstand (Stock 1*10EXP5 inf. Partikel/ml).

Mit dem auf Farbpartikel basierenden System konnte eine Nachweisgrenze von ca. 100 PFU/ml erreicht werden. Neben dem Marburgvirus spielt auch der Nachweis des Ebolavirus eine wichtige Rolle bei der Vor-Ort-Diagnostik. Um die Handhabung im Feld möglichst einfach zu halten, wurde eine Strategie zur Detektion beider Viren auf einer Abicapsäule entwickelt. Dabei wurden blaue Partikel mit Marburg spezifischen Antikörpern, sowie rote Partikel mit Ebola spezifischen Antikörpern gekoppelt. Je nach vorhandenem Analyten verfärbt sich der Messfilter blau (für Marburgviren) oder rot (für Ebolaviren). Über die Wahl geeigneter Leuchtdioden/Photodioden Paarungen ließen sich beide Analyten im Photometer voneinander diskriminieren.

### 6.3 Testentwicklung am Beispiel des Analyten B.anthracis

Für den Analyten B.anthracis wurden durch das RKI (Dr. Kühn; Dr. Klar) die Antikörperklone PC114, PC115 der IgY H64-BA sowie Perchloressigsäure inaktiviertes Sporenmaterial zur Verfügung gestellt. Hier wurde eine Reihe von Immobilisierungsstrategien durchgeführt, die zu keinem Ergebnis führten. Schließlich entschieden wir uns für ein Vorinkubationssystem mit Protein G auf der Filteroberfläche. Bei dieser Ausführungsvariante wird die Probe (Anthraxsporen) mit einem Antikörperpärchen (IgG + IgY) vorinkubiert und anschließend auf den Messfilter gegeben. Die Detektion erfolgt dann über SA-pHRP. Mit den vom RKI bereit gestellten Antikörpern konnte eine Nachweisgrenze von ca. 5*10EXP4 Sporen erzielt werden (Abb.8). Auch hier wurden mehrere Kits zusammengestellt und zu weiteren Testungen an das RKI versendet.

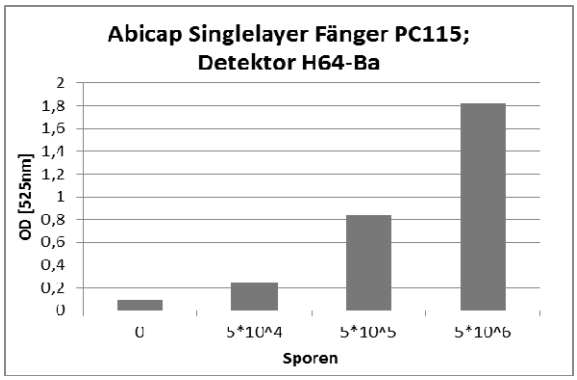


Abb.8: Abicap (1-Parameter); Messfritte mit Protein G; Fängerantikörper Clone PC115; biot. Detektorantikörper Clone H64-Ba; Enzymatischer Nachweis mit SA-poly-HRP.

## 6.4 Testentwicklung am Beispiel des Analyten Orthopockenviren

Die Testentwicklung für den Analyten Orthopockenviren wurde in enger Kooperation mit Herrn Stern (RKI) am FZMB durchgeführt. Bei der Entwicklung eines Orthopocken-schnelltests wurden 2 Konzepte unterschieden. Bei dem ersten Konzept handelt es sich um einen serologischen Test zum Nachweis von Antikörpern bei mit Orthopocken infizierten Personen. Bei dem zweiten Konzept handelt es sich um einen direkten Nachweis von Viruspartikeln.

Bei dem serologischen Nachweis von OPV-Antikörpern wurden in einem ersten Schritt Lysate aus mit OPV infizierten Zellen als Beschichtungsoberfläche auf den Filtern benutzt. Humane IgG aus positiv getestetem Serum binden spezifisch an bestimmte Proteinbestandteile des immobilisierten Lysates. Die Detektion der humanen IgG erfolgte anschließend über anti-human IgG-HRP Konjugat. Anhand von positivem (Serum 18 von einem als Kind immunisierten Spender) und negativem (Serum 45 von einem nicht immunisierten Spender) Serum konnte die Spezifität des Testes in unterschiedlichen Verdünnungsstufen gezeigt werden. Um die Sensitivität des Abicaptestes weiter zu steigern, wurde rekombinantes OPV-Oberflächenantigen auf der Filteroberfläche immobilisiert (Antigene positiv: A33R und B5R; Negatives Referenzantigen aus E.Coli: L1R). Anschließend wurde die Sensitivität des Testes mit positivem Kontrollmaterial (VIG) getestet. Im Ergebnis zeigte das Antigen A33R im Vergleich zu B5R ein besseres Signal/Rauschverhältnis (höhere Sensitivität). Die Referenz L1R war bei allen getesteten Verdünnungsstufen des positiven Kontrollmaterials negativ. Die Nachweisgrenzen für das Antigen A33R lagen bei einer VIG-Verdünnungsstufe von 1:5000 und für B5R bei 1:1000. Zur Verifizierung der Spezifität des Abicaptestes wurde positives Serum 18 und negatives Serum 45 erfolgreich verwendet. Als Ergebnis konnte ein 2-parametriger Abicaptest auf Basis von OPV-Lysaten, sowie ein 3-paramteriger Abicaptest auf Basis von rekombinanten Antigenen zur Untersuchung von Seren erfolgreich etabliert werden.

Das zweite Konzept zielt auf die Etablierung eines Abicaptestes zum direkten Nachweis von OPV-Partikeln ab. Hierbei wurden durch das RKI die rekombinanten Antikörper A3/710-20 und A1/40-1 zur Verfügung gestellt. Beide Antikörper wurden in unterschiedlichen Konzentrationen als Fänger sowie als Detektor gegeneinander titriert. Anschließend wurden mit UV inaktiviertem Kontrollmaterial Konzentrationsreihen aufgenommen. Der sensitivste Nachweis von inaktivierten OPV war für die Kombination aus A1/40-1 (Fänger) und A3/710-20 (Detektor) fest zu stellen. Hier konnte eine Nachweisgrenze von 8*10EXP3 PFU/ml erbracht werden. (Abb. 9)

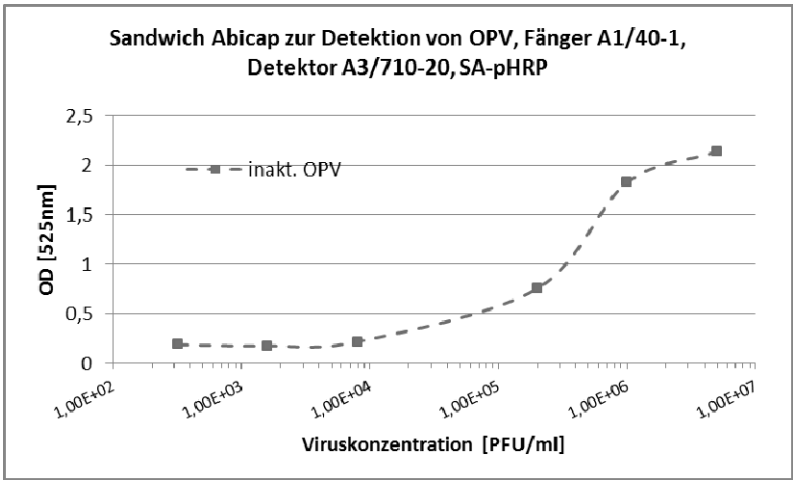


Abb. 9: Abicap (1-Parameter); Messfritte mit Antikörperclone A1/40-1; biot. Detektorantikörper Clone A3/710-20; Konzentrationsreihe mit inaktivierten Viruspartikeln; Enzymatischer Nachweis mit SA-poly-HRP.

Darüber hinaus wurde eine Konzentrationsreihe mit rekombinantem OPV-Oberflächenantigen (A27L) durchgeführt. Hier konnte eine Nachweisgrenze im unteren pg/ml Bereich erzielt werden (Abb. 10). Im Ergebnis konnte ein Abicap zur Detektion von OPV-Partikeln erfolgreich etabliert werden.

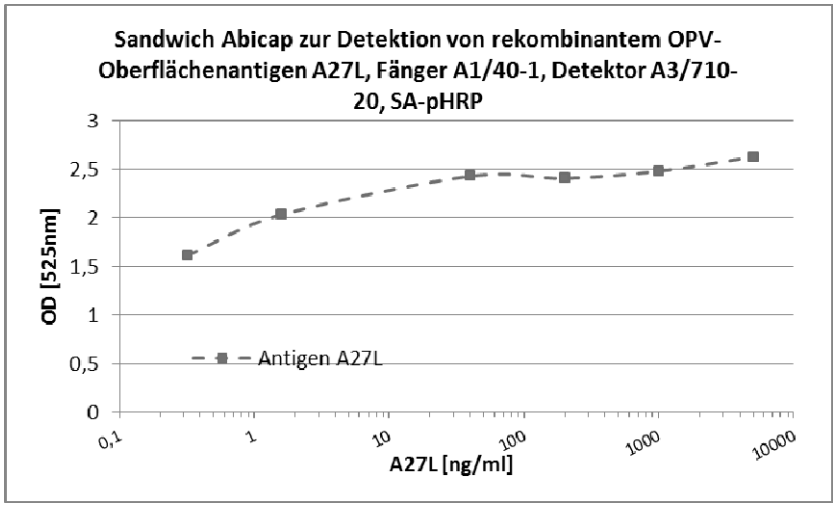


Abb.10: Abicap (1-Parameter): Messfritte mit Antikörperclone A1/40-1; biot. Detektorantikörper Clone A3/710-20; Konzentrationsreihe mit rekombinantem Antigen A27L; Enzymatischer Nachweis mit SA-pHRP.

## 6.5 Testentwicklung am Beispiel des Analyten BoNT/F

Die Testentwicklung bei BoNT/F erfolgte in Kooperation mit dem RKI (Dr. Schreiber). Durch das RKI wurden die Antikörperklone F220/4 (Fänger) und F754 (Detektor) zur Verfügung gestellt. So wie in den vorangegangenen Entwicklungen wurde das Antikörperpärchen auch hier auf der Abicapplattform etabliert. Es konnte eine Nachweisgrenze mit BoNT/F von 2 ng/ml erzielt werden. Ein 3-parametriger Abicaptest auf Basis der genannten Antikörperklone wurde entwickelt. Eine ausreichende Menge an Tests wurde produziert und für weitere Versuche an das RKI (Frau Schreiber) versendet. Am RKI wurden anschließend Versuche zur Nachweisgrenze für BoNT/F sowie BoNT/F Complex durchgeführt. Für das Toxin wurde von Frau Schreiber ein Limit von 2 ng/ml und für das komplexierte Toxin eine Nachweisgrenze von 9 ng/ml erzielt (Abb. 11).

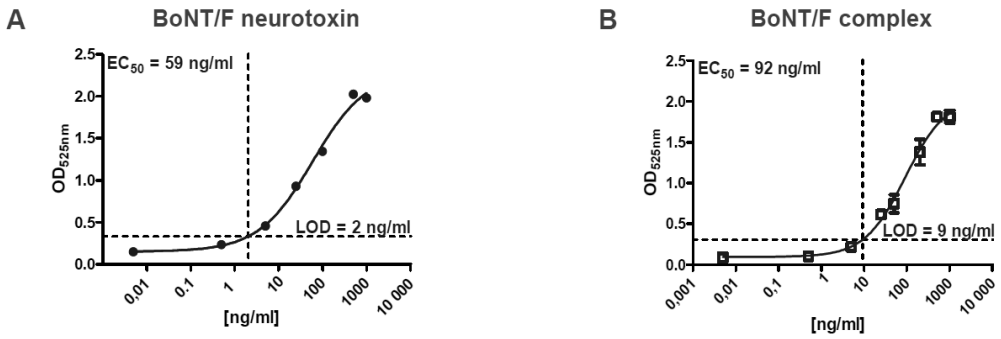


Abb.11: Abicap (1-Parameter): Messfritte Antikörperclone F220/4; biot. Detektor Antikörperclone F754; Konzentrationsreihe mit BoNT/F bzw. Mit BoNT/F complex; Enzymatischer Nachweis mit SA-pHRP.

Durch Frau Schreiber erfolgten weitere Versuche zur Spezifität und zur Detektion von BoNT/F in verschiedenen Matrices (Milch, Orangensaft und Bouillon), die alle positiv verlaufen sind. Im Ergebnis wurde ein 3-parametriger Abicaptest zur Detektion von BoNT/F entwickelt.

## 6.6 Testentwicklung am Beispiel des Analyten NTNH

Die Testentwicklung für NTNH Komplexprotein erfolgte in Kooperation mit Frau Krämer (RKI). Hierzu wurden uns durch das RKI 2 Fängerklone (1361/71 sowie 1343/6/1) und ein Detektorklon IgY (H74-Pool4) zur Verfügung gestellt. Wie in den vorangegangenen Entwicklungen erfolgte auch hier im ersten Schritt eine Titration der Antikörper sowie die Bestimmung der Nachweisgrenze auf der Abicapplattform. Dabei stellte sich heraus, dass die Kombination aus 1361/71 mit H74-Pool4 ein besseres Signal/Rauschverhältnis erbrachte als die Kombination 1343/6/1 mit H74-Pool4. (Abb.12)

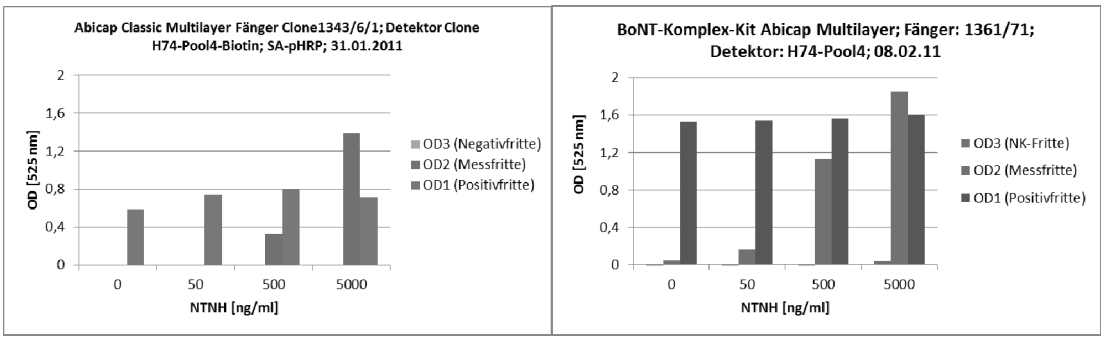


Abb. 12: Abicap (1-Parameter): Messfritte mit Antikörperclon 1343/6/1 (links), 1361/71 (rechts), biot. Detektorantikörper Clone H74-Pool4; Konzentrationsreihe mit rekombinantem NTNH; Enzymatischer Nachweis mit SA-pHRP.

Mit beiden Varianten wurden Testkits zusammengestellt und für weitere Versuche an das RKI (Frau Krämer) versendet. Am RKI wurden Kalibriergeraden aufgenommen und Versuche zur Titration des Detektorantikörpers durchgeführt. Dabei konnten Nachweisgrenzen von 5 ng/ml (Kombination 1361/71 mit H74-Pool4) sowie 20 ng/ml (Kombination 1343/6/1 mit H74-Pool4) ermittelt werden (Abb. 13). Im Ergebnis wurde ein 3-parametriger Abicaptest zur Detektion von NTNH Komplexprotein entwickelt.

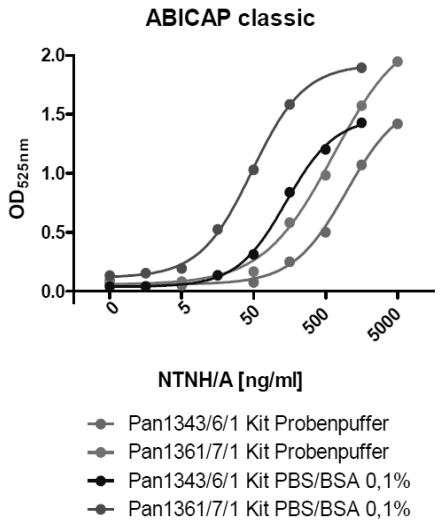


Abb.13: Abicap: Messfritte mit Antikörperclone 1361/71 (grün), 1343/6/1 (blau); biot. Detektorantikörper H74-Pool4; Konzentrationsreihe mit BoNT/A complex; Enzymatischer Nachweis mit SA-pHRP

## 6.7 Testentwicklung am Beispiel des Analyten BoNT/E

Bei BoNT/E wurde auf ein Antikörperpärchen der Firma Senova zurückgegriffen. Hier wurde ein 3-parametriger Abicaptest aufgebaut und eine ausreichende Menge Tests hergestellt. Diese wurden anschließend an das RKI (Frau Rybarczyk, Frau Schreiber) versendet. Dort wurden Untersuchungen zur Nachweisgrenze, zur Kreuzreaktivität sowie zu Matrixeffekten durchgeführt. Die ermittelte Nachweisgrenze lag im pg/ml Bereich. Es konnten keine Kreuzreaktivitäten mit BoNT/A, B, F sowie deren Komplexproteinen und Rizin, Abrin, SEB festgestellt werden. Darüber hinaus konnte gespiktes BoNT/E in den Matrizes Nasenschleimhaut, humanes Serum, Milch nachgewiesen werden.

## 6.8 Weiterentwicklung eines dekontaminierbaren Abicapphotometers

Auf Basis des Abicap Multilayer Photometers wurde ein feldtaugliches Gerät entwickelt, das den Anforderungen von BBK und BKA als mobiles, energieautarkes und dekontaminierbares Lesegerät gerecht wird (Abb. 14). Zur bestmöglichen Bedienbarkeit im Realeinsatz wurde ein hintergrundbeleuchtetes Grafikdisplay verbaut, das übersichtliche Menüstrukturen und große Ergebnisanzeigen ermöglicht. Die Bedienung erfolgt über ein Keypad mit großen Tasten und deutlichem Druckpunkt. Firmwareseitig wurde die „NoTouch“ Steuerung implementiert: Das Gerät erkennt über einen Präsenzsensor, wenn eine Abicapsäule eingelegt wird und startet automatisch die Messung. In diesem Fall wird das Gerät eingeschaltet und kalibriert in die Gefahrenzone gebracht und liefert Ergebnisse ohne jeden Tastendruck.

Das Gehäuse wurde komplett wasserdicht konzipiert und aus einem chemieresistenten Kunststoff gefertigt, der sogar die Tauchdekontamination des Gerätes zulässt. Ein Schubfach für Realprobenzubehör wurde integriert. Diese Kammer wird bei der Tauchdekontamination ebenfalls geflutet, so dass ein unbemerktes Ausbringen von Gefahrstoff unterbunden wird. Oberhalb der Messkammer befindet sich ein Klemmschacht für die sichere Verwahrung der Referenzmesssäule.

Insgesamt wurden fünf dieser Gehäuse im Rapid Prototyping Verfahren hergestellt.

Mit Hilfe von Lichtleitfasern werden die optischen Bauelemente an den Messkopf gekoppelt. Die teure Elektronik kann dadurch im Inneren des Gehäuses optimal geschützt werden. Um die im Projekt geforderten Sensitivitäten zu erreichen, wurde zusätzlich zur Messwellenlänge (525 nm) eine Referenzwellenlänge (650 nm) implementiert, die besonders im unteren Teil des dynamischen Bereichs eine verbesserte Präzision ermöglicht.

Die bisher verwendete RS232 Datenverbindung wurde durch einen wasserdichten USB Port an der Geräterückseite abgelöst. Die integrierte Ladeschaltung erkennt eine USB Verbindung und lädt das Gerät auch während der Datenübertragung am PC auf.

Zur drahtlosen Datenübertragung wurden ein Infrarot Sender sowie eine Bluetooth Schnittstelle implementiert. Eine prototypische Windows Applikation zur Archivierung der Messdaten wurde erstellt und in Feldsimulationen getestet.

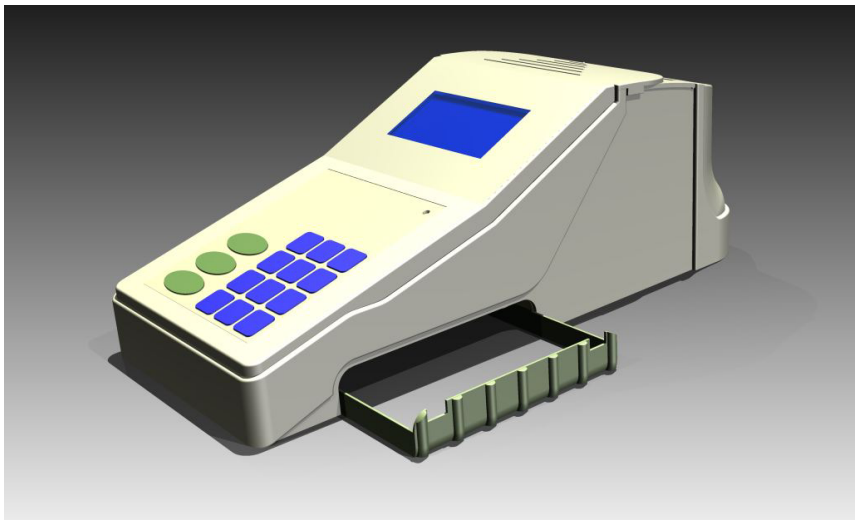

Abb.14: Dekontaminierbares Abicapphotometer

## 6.9 Einsatz von Aptameren auf der Abicapplattform zur Detektion von H1N1

Durch die Aptares AG wurde der FZMB GmbH ein Aptamerpärchen für die spezifischen Detektion von H1N1-Viruspartikeln (Grippevirus) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um das Fängeraptamer 2-B3 und das Detektoraptamer 2-C1 (Aptamer-POD-Konjugat). Nach der Beschichtung der Filteroberfläche mit dem Fängeraptamer wurde die Funktionalität des Abicaptestes mit inaktivem H1N1-Kontrollmaterial geprüft. Selbst für eine Probenkonzentration von 100 ng/ml konnte kein spezifisches Signal detektiert werden. Die Ursache hierfür konnte im Rahmen dieses Projektes nicht geklärt werden. Da auf der Abicapplatform Antikörper basierende Binder sehr gute reproduzierbare Resultate erbracht haben, wurde der Fokus auf die Implementierung von IgG und IgY gelegt. Aptamere werden als alternative Binder für die Abicapplatform nicht ausgeschlossen. Allerdings bedarf es hier weiterer intensiverer Grundlagenforschung, was bei Projektstart so nicht abzusehen war.

## 7 Verwertbarkeit des Ergebnisses und der Erfahrungen

Die im Projekt eingesetzte ABICAP Technologie wird vom FZMB im Rahmen eines Kooperations- und Lizenzabkommens mit der Firma Senova GmbH (Weimar) bearbeitet. Da die Grundkomponenten zur Herstellung von ABICAP Testsystemen im industriellen Maßstab von Senova produziert und vertrieben werden, war es im Projekt effizient und schnell möglich, die von den Partner bereitgestellten neuartigen Antikörper in das Testsystem zu implementieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist innerhalb von wenigen Wochen in anderen Testssystemen, insbesondere im ELISA etablierte Immunreagenzien auf die ABICAP Plattform zu übertragen. Größere Unsicherheiten, wie sie typischerweise bei Einsatz von neuartigen Testplattformen auftreten, gab es beim ABICAP System nicht. Es werden dabei Leistungsdaten erreicht, die in der Regel mindestens denen des ELISAs entsprechen. Diese Erkenntnis ist von strategischer Bedeutung, da damit eine Schnelltestplattform bereitgestellt werden konnte, die auch bei anderen kurzfristig relevant werdenden Agenzien und Bedrohungslagen schnell eine dezentrale Analytik ermöglichen wird. Mit dem im Rahmen des Projektes entwickelten dekontaminierbaren Photometer steht dazu zudem auch ein preisgünstiges und stabiles Auslesesystem zur Verfügung.

Die im Projekt entwickelte und erstmals eingesetzte Mehrfarbendetektion sowie der Einsatz von enzymmarkierten Farbstoffkonjugaten wird darüber hinaus die Attraktivität der ABICAP Plattform erhöhen.

Die entwickelten Analysekits werden im Rahmen des bestehenden Kooperations- und Lizenzabkommens mit der Firma Senova von dieser produziert und direkt und über die Firma Diavita GmbH vermarktet. Dabei kommen allerdings nicht in allen Fällen die Rahmen des Projektes von den Partnern entwickelten Reagenzien zum Einsatz, da die mit dem RKI diskutierten Lizenzierungskonditionen vor dem Hintergrund der Einsatzcharakteristik des ABICAPs und einer stark schwankenden und instabilen Nachfrage nach Testsystem wenig attraktiv erscheinen. Zwischen der Firma Senova und dem FZMB besteht Konsens, die existierenden Kits zum Nachweis von biologischen Agenzien weiterzuentwickeln um zum einen den spezifischen Reagenzienverbrauch pro Test und damit die Produktionskosten zu senken und zum anderen die Handhabbarkeit der Testkartuschen zu vereinfachen. Der zweite Punkt ist offensichtlich für einen breiteren Markterfolg von entscheidender Bedeutung, da nach Aussage von im Projekt beteiligten Anwendern in vielen praktischen Einsatzsituationen einfach Teststreifen mit schlechten Nachweisgrenzen komplexeren Tests, wie dem ABICAP Test mit einer deutlich besseren Testperformance vorgezogen werden. Der jetzt erreichte Stand der Technik bietet diesbezüglich gute Voraussetzungen und die im Projekt etablierten Kooperationen eine gute Infrastruktur, um diese Produktpflege zu realisieren.

Diesbezüglich sollte abschließend noch einmal erwähnt werden, dass die Struktur des BIGRUDI Konsortiums, insbesondere die Einbeziehung von Anwendern ideale Voraussetzungen für die Entwicklung von anspruchsvollen Testsystemen für diesen spezifischen Nischenmarkt geboten hat.

## 8 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens an anderen Stellen

Während der Laufzeit des Projektes wurden nur Versuche bekannt, die dem Stand der Technik entsprechen, insbesondere sind mehrere Lateral Flow Streifen Tests entwickelt worden (Miprolab Göttingen). Dazu wurden teilweise auch die im Projekt generierten Antikörper eingesetzt. Die Leistungsdaten entsprechen etwa den bisher bekannten und bisher publizierten Nachweisgrenzen, aber erreichen nicht die Nachweisgrenzen wie sie im Abicap erzielt werden. Dieser Befund wurde auch im Rahmen eine EU Projektes bestätigt, bei dem alle in Europa verfügbaren Schnelltests getestet worden sind.

## 9 Veröffentlichungen, Poster und Vorträge

Im Rahmen des Projektes wurde ein Patent angemeldet: „Vorrichtung zur Durchführung eines affinitätschromatographischen Probentests“ PCT/EP 2010/058628 (18.06.2010). Die Partner des Verbundprojektes BigRudi haben ihre Ergebnisse regelmäßig publiziert bzw. auf relevanten Fachveranstaltungen vorgetragen, um einerseits die erzielten Fortschritte vorzustellen und andererseits Anregungen von anderen Forschern zu bekommen. Die FZMB GmbH selbst hat neben Vorträgen im Rahmen der Projekttreffen folgende Poster ausgestellt.

**Poster:** **„Adaption ausgewählter Antikörperpaare auf die Abicapplattform am Beispiel der Detektion von Marburgviren“**

**„Simultaneaous detection of Marburg and Ebola viruses in imuno filtration columns”**

**“Etablierung eines Schnelltests zur Detektion von Orthopockenviren auf Basis der 3D-Immunfiltrationstechnologie“**